



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Anastazija Ratkajec

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE PROTEINSKIH SUSTAVA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2019. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

05. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE PROTEINSKIH SUSTAVA.....	2
2.1. PROTEINSKI SASTAV.....	2
2.1.1. AMINOKISELINE.....	2
2.1.2. PEPTIDI I PROTEINI	3
2.2. STABILNOST PROTEINA	4
2.3. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE	4
2.3.2. DIPOL-DIPOL INTERAKCIJE	6
2.3.3. ELEKTROSTATSKE INTERAKCIJE.....	6
2.3.4. SVOJSTVA VODE.....	7
2.3.5. VODIKOVE VEZE	7
2.3.6. HIDROFOBNI EFEKT	8
2.4. PROTEINSKA STRUKTURA	9
2.4.1. PRIMARNA STRUKTURA PROTEINA.....	9
2.4.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PROTEINA	10
2.4.3. TERCIJARNA STRUKTURA PROTEINA.....	13
2.4.4. KVATERNA STRUKTURA PROTEINA.....	13
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XV

§ Sažetak

Proteini se sastoje od velikog broja aminokiselina tj. kažemo da su biološki polimeri. Njihovu razinu organizacije promatramo na nekoliko razina. Aminokiseline kovalentno povezane peptidnim vezama čine primarnu strukturu proteina. Proteini ne ostaju u linearnom obliku, nego se nastoje saviti u manje lokalne 3D strukture koje nazivamo sekundarna struktura, a potom i u globalnu 3D strukturu tj. tercijarnu strukturu proteina. Vrste interakcija koje određuju 3D oblik, a time i funkciju proteina su: vodikove veze između segmenata okosnice i bočnih lanaca, ionske veze između skupina na bočnim lancima, hidrofobne interakcije, dipol-dipol interakcije i kovalentne veze dvaju sumpora bočnih lanaca cisteina. Ove interakcije stvaraju slabe, ali stabilne sile koje se mogu formirati i slamati ovisno o promijeni uvjeta okoline. One pokreću spontano savijanje lanaca polipeptida kod proteina, a odgovorne su i za strukture nukleinskih kiselina i spontano stvaranje membrana. Također posreduju uzajamno prepoznavanje komplementarnih molekularnih površina čime se omogućuje specifična funkcija proteina. Veliki doprinos stabilnosti proteina potječe iz okolnog tekućeg medija i entropijske je prirode. Stoga, pri razmatranjima i predviđanjima proteinskih struktura i funkcija mora se uzeti u obzir cijeli sustav: otapalo (koje je najčešće vodena otopina) i proteini.

Povezanost trodimenzionalne strukture proteina i njegove funkcije uzrokuje veliki interes za predviđanjem strukture proteina. S obzirom na to da je proces smatanja vrlo složen, poseže se za računalnim simulacijama. One nam omogućuju da simuliramo brzinu i mehanizam smatanja te da odredimo alternativne puteve smatanja. Sve navedeno je jaka motivacija razumijevanja međumolekulskih interakcija u proteinskim sustavima.

§ 1. UVOD

Povijesno je kemija u velikoj mjeri okarakterizirana kao proučavanje kovalentnih interakcija unutar molekula. Uistinu, opis kovalentne veze spada među velike uspjehe moderne kemije. Priroda stvaranja i pucanja kovalentnih veza dobro je razumljiva i danas metode računalne kemije mogu vrlo dobro opisati te procese. Kovalentne interakcije puno su bolje razjašnjene od nekovalentnih interakcija. Razlog tome je njihova uloga u biomolekulskim strukturama.

Proteini posreduju gotovo u svakom procesu koji se odvija u stanici, pokazujući veliku raznolikost funkcija te ne čudi da su upravo proteini najzastupljenije biološke makromolekule koje se javljaju u svim dijelovima organizma. Interakcije unutar makromolekule određuju njezin oblik i polarnost, a samim time njezinu ulogu i interakciju s drugim molekulama. Enzimi su proteini koji kataliziraju kemijske reakcije u živim bićima. Aktivno mjesto enzima sadrži aminokiseline koje vežu supstrat i kofaktore nekovalentnim interakcijama, i katalitičke aminokiseline koje sudjeluju u stvaranju i kidanju kemijskih veza. Specifičnost interakcije enzima i supstrata uglavnom je rezultat prostorno usmjerenih međumolekulskih interakcija, te oblika aktivnog mjesta, koje odbacuje one molekule se ne mogu vezati na adekvatan način. Oblik aktivnog mjesta također je rezultat nekovalentnih interakcija među dijelovima unutar proteina. Iako mnogi proteini svoje funkcije obavljaju neovisno, velika većina međudjeluje s drugim proteinima, molekulama i ionima što im omogućuje izvođenje odgovarajuće biološke aktivnosti.

Problem odnosa strukture i funkcije u proteinima jedan je od temeljnih problema znanosti o proteinima. Odnosno, koje su pokretačke snage odgovorne za usvajanja proteinskih struktura s određenim biološki relevantnim svojstvima? Također, možemo li predvidjeti funkcionalna svojstva proteinske molekule ako znamo njezinu strukturu? Kako se mijenjaju funkcionalna svojstva kada se mijenja struktura proteina? Stoga, postaje očito da razumijevanje strukture, funkcije te odnosa strukture i funkcije zahtijeva karakterizaciju interakcija unutar proteina, te proteina i drugih vrsta.

§ 2. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE PROTEINSKIH SUSTAVA

2.1. PROTEINSKI SASTAV

2.1.1. AMINOKISELINE

Aminokiseline su monomerne jedinice koje grade linearne polimere zvane proteini. Svi proteini, u svim vrstama - bakterijskim, arhejskim i eukariotskim - izgrađeni su od istog skupa 20 standardnih aminokiselina uz samo nekoliko izuzetaka. Svih 20 uobičajenih aminokiselina su α -aminokiseline tj. imaju primarnu amino skupinu (izuzetak je prolin) i karboksilnu skupinu, te vodik i karakterističnu bočnu skupinu R povezanu na isti centralni, takozvani, α -ugljikov atom. Skupine α -amino i α -karboksilna imaju kiselo-bazna svojstva te su u fiziološkom pH području potpuno ionizirane te stoga aminokiseline mogu djelovati kao kiseline ili baze. Za tvari s navedenim svojstvom kažemo da su amfoterne, a nazivamo ih amfolitima (*amfoterni elektroliti*). Zbog amfoternosti, pri određenim pH uvjetima, aminokiseline sadrže i negativno nabijenu karboksilnu skupinu i pozitivno nabijenu amino skupinu te takve molekule, koje nose nabijene skupine suprotne polarnosti, nazivamo zwitterionima. Iako posjeduju pozitivni i negativni naboj, aminokiseline su često električki neutralne kao rezultat protoniranosti ili deprotoniranosti njihovih skupina. Posljedica zwitterionskog karaktera aminokiselina su fizikalna svojstva karakteristična za ionske spojeve kao povišeno vrelište i bolja topljivost u polarnim otapalima, što je iznimno važno za interakcije koje mogu ostvarivati.

Aminokiseline se obično klasificiraju prema kemijskim karakteristikama bočnih ogranka koje označavamo slovom R. Bočni ogranci, odnosno R-skupine, čine alifatski ili aromatski bočni lanci koji mogu imati vezane reaktivne skupine bazičnog ili kiselog karaktera, veće ili manje polarnosti te hidrofilne ili hidrofobne skupine. Osnovna je podjela na četiri skupine prema polarnosti tj. tendenciji interakcije s vodom pri biološkom pH:

1. Aminokiseline s nepolarnim bočnim ograncima
2. Aminokiseline s polarnim bočnim ograncima
3. Aminokiseline s kiselim bočnim ograncima
4. Aminokiseline s bazičnim bočnim ograncima

U klasu nepolarnih aminokiselina spadaju aminokiseline alifatskih bočnih ogranka: Gly, Ala, Val, Leu, Ile i Pro. Među navedenim aminokiselinama nalazimo alifatske ogranke u rasponu od vodikova atoma do butilne skupine. Prolin se razlikuje od ostalih po tome što je bočni lanac vezan na α -ugljikov atom i dušikov atom, čime tvori pirolidinski prsten.

Aromatske bočne ogranaka posjeduju: Phe, Tyr i Trp koje karakterizira veličina, ali i nepolarnost. U osnovi navedene aminokiseline su nepolarne stoga djeluju uglavnom hidrofobnim interakcijama i Van der Waalsovima silama, a razlika u veličini i obliku bočnih

ogranaka omogućuje im da interagiraju tako da tvore kompaktne strukture s malo praznog prostora.

Šest aminokiselina se obično klasificira prema nenabijenom polarnom bočnom lancu: Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn i Gln. Dok Ser, Thr i Tyr sadrže alkoholnu skupinu na hidrofbnom bočnom ogranku, Asn i Gln imaju amidnu terminalnom skupinu. Spomenute aminokiseline su polarnije i reaktivnije zbog prisutnosti elektronegativnog kisikovog i dušikovog atoma, koji odvlače elektrone prema sebi, što čini ove polarizirane aminokiseline vrlo pogodnim za ostvarivanje vodikovih veza. Tvorbom vodikovih veza ove aminokiseline postaju topljive u vodi tj. hidrofilnije. Aminokiselina Cys sadrži tiolnu skupinu koja je reaktivna i blago polarna. Cistein je slaba kiselina te ostvaruje vrlo slabe vodikove veze, no zato sudjeluje u nastajanju kovalentnih disulfidnih veza s drugim cisteinom putem oksidacije. Te jake kovalentne veze naročito su važne u stabilizaciji i povezivanju dijelova unutar proteina, ali i među proteinima.

Aminokiseline s negativno nabijenim bočnim lancem su: Asp i Glu što je posljedica deprotoniranja asparaginske i glutaminske karboksilne kiseline pri fiziološkom pH, te ih stoga zovemo kiselim aminokiselinama. Aminokiseline s pozitivno nabijenim bočnim lancem su: Lys, Arg i His te mogu akceptirati proton, što ih čini bazičnim i vrlo hidrofilnim aminokiselinama. Nabijene aminokiselina imaju sposobnost ostvarivanja ionskih interakcija.¹⁻³

2.1.2. PEPTIDI I PROTEINI

Dvije aminokiseline se međusobno mogu vezati tako da reakcijom između α -karboksilne skupine jedne i α -amino skupine druge aminokiseline nastane amidna veza uz izlazak molekule vode. Tako nastali amidi zovu se peptidi, a veza između njih je peptidna veza, koja je po svojoj prirodi kovalentna veza. Ponavlja se slijed gdje su α -ugljikovi atomi susjednih aminokiselina odvojeni s tri kovalentne veze, od kojih je jedna peptidna, u obliku $C_\alpha-C-N-C_\alpha$. Difrakcijom rendgenskog zračenja pokazalo se da je C—N veza peptida kraća nego kod jednostavnog amina i da su atomi povezani peptidnom vezom koplanarni. To je ukazalo na rezonanciju tj. djelomičnu podjelu dva para elektrona između karbonilnog kisika i amidnog dušika. Kisik ima djelomično negativan naboj, a vodik vezan na dušik ima parcijalno pozitivan naboj. Zbog tog parcijalnog karaktera dvostruke veze, peptidne veze ne mogu slobodno rotirati. Rotacija je omogućena oko $C_\alpha-C$ i $N-C_\alpha$ veze. Krute peptidne veze stoga ograničavaju raspon konformacija koji su mogući za polipeptidni lanac. Polimeri aminokiselina povezani peptidnomvezom tvore gusto pakirane globularne strukture. Polipeptidima nazivamo strukturu koja nastaje povezivanjem većeg broja aminokiselina, 10 i više⁴, na opisani način. Polipeptidni lanac sastoji se od pravilno ponavljajućeg dijela zvanog glavni lanac ili okosnica, te od promjenjivog dijela kojeg sačinjavaju karakteristični bočni lanci povezanih aminokiselina. Okosnica je bogata potencijalom vezanja vodikovim vezama jer se sastoji od karbonilne skupine ($C=O$), koja je dobar akceptor vodikove veze, te NH skupine koja je dobar donor vodikovih veza. Te skupine interagiraju međusobno, ali i s funkcionalnim skupinama bočnih lanaca radi stabilizacije određenih struktura.

Polipeptidne lance koji imaju molekularnu masu iznad 10 000 te neku bilošku ulogu nazivamo proteinima (granica nije striktna).⁵ Proteini mogu biti građeni od jednog polipeptidnog ili više polipeptidnih lanaca. Svaki polipeptidni lanac takvih proteina nazivamo podjedinice i one se pretežito drže na okupu nekovalentnim interakcijama. Postoje primjeri

proteina, kao što je inzulin, gdje se dva ili više polipeptidna lanca spajaju disulfidnom vezom, dakle kovalentnom vezom.^{6,7}

2.2. STABILNOST PROTEINA

Termodinamička mjerenja pokazuju da su nativni proteini samo rubno stabilne tvorevine pri fiziološkim uvjetima. Stabilnost se može definirati kao sposobnost održavanja nativne konformacije. Slobodna energija denaturacije iznosi oko $0,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ po aminokiselinskom ostatku, tako da je protein, sastavljen od 100 ostataka, stabiliziran energijom od $40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Usporedbom s energijom potrebnom za cijepanje tipične vodikove veze $\sim 20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ uočava se da je navedena energija vrlo malena. Polipeptidni lanac može zauzeti izrazito velik broj konformacija, stoga nesmotano stanje proteina karakterizira visok stupanj konformacijske entropije. Ta entropija, skupa s vodikovim vezama između polipeptidnih skupina i vode, ima tendenciju zadržavanja takvog stanja. Međutim, takvo stanje izrazito je entropijski nepovoljno za molekule vode koje hidratiziraju nepolarne bočne ogranke aminokiselina. Smatanje proteina oslobađa takve molekule vode i omogućava njihovu slobodnu translaciju i rotaciju što je entropijski izuzetno povoljno. Upravo taj entropijski efekt, koji se još naziva i hidrofobnim efektom, skupa s interakcijama koje održavaju nativnu strukturu proteina, poput elektrostatskih interakcija (privlačne i odbojne), vodikovih veza, hidrofobnih interakcija i disulfidni mostova, dovode do smatanja proteina. Energetske vrijednosti navedenih interakcija su reda veličine $10^3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ za tipični protein. Prema tome, jasno je da proteinska struktura nastaje iz osjetljive ravnoteže snažnih kompenzacijskih sila na koje ćemo opravdano obratiti veliku pažnju.⁸

2.3. MEĐUMOLEKULSKE INTERAKCIJE

Međumolekulske interakcije su sile koje posreduju interakciju među molekulama, uključujući sile privlačenja ili odbijanja koje djeluju između molekula i drugih susjednih čestica kao što su atomi ili ioni. Međumolekulske sile su slabe u odnosu na intramolekulske sile koje molekulu drže na okupu, kao što je kovalentna veza. Usprkos tome, presudne su za biokemijske strukture i procese.

S obzirom na to da atomi imaju radijus od 1,0 do $1,5 \text{ \AA}$, a najbliža kontaktna udaljenost dvaju atoma je reda $2,2 \text{ \AA}$, jasno je da određene orijentacije peptidnih jedinica nisu moguće iz steričkih razloga. Ovo nam daje dobru predodžbu o mogućim tj. dopuštenim konformacijama, no ne govori nam ništa o prirodi formiranja konformacije koja je energetski optimalna i favorizirana. U tu bi svrhu trebalo razraditi potencijalnu energiju različitih konformacija jer se očekuje da najpovoljnijim konformacijama odgovaraju najmanje energije. Međutim, kako bi se izračunala ukupna potencijalna energija molekule u određenoj konformaciji potrebno je znati vrste interakcija među atomima koji doprinose stabilnosti kristalne rešetke te jednadžbe tih veličina. Takve informacije dobivene su teorijskim studijama te podatcima dobivenim iz infracrvenih spektara, mikrovalnih spektara, itd.

Pretpostavka s kojom krećemo jest da kovalentne veze molekula koje interagiraju nisu pod utjecajem tih interakcija, stoga su međumolekulske udaljenosti i kutevi relativno očuvani.^{9-11,15,16}

2.3.1. VAN DER WAALSOVE PRIVLAČNE SILE I REPULZIVNE INTERAKCIJE

London je utemeljio teoriju privlačnih sila dobivši izraz za interakcije koju obično nazivamo: van der Waalsove privlačne interakcije ili Londonovim disperznim silama. Jezgre i elektronski oblaci atoma su u kontinuiranom oscilatorskom kretanju, što dovodi do razdvajanja središta pozitivnih i negativnih naboja čime se formiraju prijelazni dipolni momenti. Ova asimetrija u elektronskom oblaku djeluje na susjedne atome te izaziva komplementarnu asimetriju raspodjele elektrona tj. induciraju dipolni moment. Atomi i njima susjedni atomi se međusobno zbog toga privlače i približavaju sve dok ih ne razdvoje repulzivne interakcije kada dođu na udaljenost manju od van der Waalsove kontaktne udaljenosti.

Energije interakcija su poprilično male, doprinose 2,0 do 4,0 kJ mol⁻¹ po paru. Međutim kada površine dvije ili više velikih molekula stupe u kontakt, tada se stvara velik broj van der Waalsovih interakcija i neto učinak je značajan. Privlačna energija tih interakcije je dana sa $E(r) = -\frac{A}{r^6}$ gdje je A definirana konstanta koja ovisi o atomskim svojstvima. Londonove disperzijske sile su značajne samo za skupine u kontaktu jer je privlačna energija proporcionalna sa r^{-6} . Upravo je usko nabijena unutrašnjost proteina idealna okolina jer nalazimo velik broj međumolekulskih kontakata, time iako slabe, Londonove disperzijske sile igraju veliku ulogu u određivanju konformacije proteina. Energija odbojne interakcije dana je izrazom $E(r) = \frac{B}{r^{-12}}$. Zbrajanjem dvaju izraza dobivamo potencijalnu energiju neveznih interakcija u obliku (1). Dobiveni izraz poznat je pod nazivom Lennard-Jonesov potencijal ili 6-12 potencijal zbog svojih eksponenata.¹¹ On je funkcija udaljenosti između središta dviju čestica. Kada su dvije čestice beskonačno udaljene jedna od druge, energija njihove interakcije je minimalna tj. uzima se kao nula. Kako se udaljenost smanjuje, privlačne interakcije rastu. Čestice se zbližavaju dok ne dosegnu područje gdje se maksimalna interakcija, odnosno energija interakcije je najnegativnija. Kažemo da postoji privlačna sila na udaljenosti gdje preklapanja njihovih elektronskih oblaka nisu značajne, tada su na udaljenosti gdje je postignuta minimalna potencijalna energija. Ako se udaljenost smanjuje dalje od ravnotežne, dolazi do odbijanja jer su čestice toliko blizu da dolazi do repulzije njihovih elektronskih oblaka. Dakle odbijanje je rezultat nastojanja atoma da zadrže prostor u svojim elektronskim oblacima i time spriječe preklapanja istih.¹²⁻¹⁴

$$E(r) = -\frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{-12}} \quad (1)$$

2.3.2. DIPOL-DIPOL INTERAKCIJE

U proteinima prisutnost elektronegativnih atoma poput kisika na karbonilnoj skupini i amidnog dušika uzrokuju dipol-dipol interakcije jer posjeduju trajne dipolne momente. One su relativno slabe, s jačinom od $-9,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, no jače su od Londonovih disperznih sila te dipol-inducirani dipol interakcija. Usprkos jačini, dipol-dipol interakcije su vrlo važne strukturne odrednice sekundarne strukture, kao što su α -zavojnice. Naime negativni krajevi dipolnih amidnih i karbonilnih skupina usmjereni su u istom pravcu, tako da su dipol-dipol interakcije (ali i druge poput vodikovih) aditivne. Zbog toga α -zavojnice imaju značajan, vrlo povoljan, dipolni moment pozitivan prema N-kraju, a negativan prema C-kraju. Stoga, u jezgri proteina s niskom dielektričnom konstantom, dipol-dipol interakcije značajno utječu na smatanje proteina.^{13,14}

2.3.3. ELEKTROSTATSKE INTERAKCIJE

Kao što je ranije spomenuto, postoje parcijalni naboji na atomima, stoga moramo uzeti u obzir elektrostatske interakcije među tim nabojima. U razumnom stupnju aproksimacije, njihove interakcije su određene zakonima klasične elektrostatike (točniji proračuni zahtijevaju primjenu kvantne mehanike). Energija povezivanja (2) dvaju električnih naboja, q_1 i q_2 , koja su razdvojena na udaljenosti r_{12} , pronalazi se integriranjem izraza za Coulombov zakon kako bih se odredio rad potreban za razdvajanje tih naboja na beskonačnu udaljenost. Poznavanjem dipolnih momenata veza možemo odrediti ukupni naboj na pojedinim atomima. Navedeni izraz (2) vrijedi samo za točkaste ili sferno simetrične naboje stoga se ovakav pristup ne može primijeniti s velikom točnošću na peptidnu okosnicu. Dobar je pristup stoga pri računanju energije peptidne okosnice, zamijeniti monopolne naboje s efektivnim dipolnim momentom pozicioniranim u središtu veze. Primjena monopolne metode zadovoljavajuća je pri određivanju udaljenih interakcija među atomima.

$$E(r_{12}) = \frac{k \cdot q_1 \cdot q_2}{r_{12}} \quad (2)$$

Asocijacija dvaju ionski skupina u proteinu suprotnih naboja nazivamo ionskim parom ili solnim mostom. Prema izrazu (2) energija tipičnog ionskog para je $-86 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ no slobodni ioni su u vodenom mediju izrazito jako solvatirani. Formacija solnog mosta ima entropijsku manu jer lokalizira skupine koje sudjeluju u takvoj interakciji. Slobodna je energija otapanja dvaju odvojenih iona približno jednaka slobodnoj energiji tvorbe njihovog nesolvatiranog ionskog para, no bez entropijske kazne. Ionski parovi, dakle, malo doprinose stabilnosti native strukture.^{9,13-16}

2.3.4. SVOJSTVA VODE

Voda je medij u kojem se odvija većina biokemijskih reakcija, a njena su svojstva ključna za stvaranje makromolekulskih struktura te za tijek biokemijskih reakcija. Posebno su relevantna dva svojstva vode:

- 1) Voda je polarna molekula. Molekula vode nije linearna, stoga je raspodjela naboja asimetrična. Jezgre kisika odvlače elektronski oblak s dviju vodikovih jezgara što ostavlja iste s parcijalno pozitivnim nabojem. Time dobivamo električno polarnu strukturu.
- 2) Voda je vrlo kohezivna. Molekule vode snažno međudjeluju jedna s drugom putem vodikovih veza. Polarna priroda vode odgovorna je za njenu visoku dielektričnu konstantu od 80. Molekule u vodenj otolini stupaju u interakciju s molekulama vode stvaranjem vodikovih veza i kroz ionske interakcije, što vodu čini svestranim otapalom. Zbog svoje električne strukture, molekula vode može primiti dvije vodikove veze te donirati još dvije, stoga ukupno može stvarati četiri vodikove veze. Nerijetko voda stabilizira proteinsku strukturu ili sudjeluje u vezanju liganada na proteine.^{17,18}

2.3.5. VODIKOVE VEZE

Vodikove veze su interakcije koji osim elektrostatske prirode, imaju i djelomično kovalentni karakter tj. bolje rečeno specijalan tip dipol-dipol interakcija, koje se javljaju kada se vodik vezan na veoma elektronegativan atom nađe u blizini drugog elektronegativnog atoma sa slobodnim elektronskim parom. Donorom vodikove veze nazivamo skupinu koja uključuje elektronegativni atom na koji je kovalentno vezan vodikov atom. Atom na koji je vezan vodik snažno odvlači elektronski oblak s vodikovog atoma i on poprima parcijalno pozitivni naboj (+ δ). Akceptorom vodikove veze nazivamo elektronegativni atom sa slobodnim elektronskim parovima, koji je slabije povezan s vodikom. On ima parcijalno negativni naboj (- δ) te tako može interagirati s parcijalno pozitivnim vodikom na donoru. Vodikove veze su mnogo usmjerenije od van der Waalsovih sila, no manje nego kovalentne veze. Ove su veze jače od običnih dipol-dipol interakcija i disperzijskih sila, no slabije su od tipičnih kovalentnih veza. Energije vodikovih veza kreću se od 4,0 do 25 kJ · mol⁻¹, vrijednosti koje su između vrijednosti kovalentnih veza i van der Waalsovih sila. Vodikove veze su najjače kada su atomi adekvatno orijentirani, a to je slučaj kada su sva tri atoma koja su uključena u interakciju na istom pravcu, pri čemu je kovalentna veza donora vodikove veze usmjerena duž orbitale elektronskog para akceptorskog atoma (ili u slučaju aromatskog prstena, okomito na ravninu prstena i usmjerena u njegovo središte). Tendencija prema linearnosti važna je za orijentaciju interagirajućih skupina te ovo svojstvo vodikove veze dovodi do vrlo preciznih trodimenzionalnih struktura proteina.

Skupine sposobne za stvaranje vodikovih veza u proteinima su raspoređene tako da se formira većina mogućih vodikovih veza. Međutim, nesmotani protein čini većinu svojih vodikovih veza sa molekulama vode u otapalu. Slobodna energija stabilizacije vodikovim vezama jednaka je razlici slobodne energije vodikovog vezanja nesmotanog i nativnog proteina. Moglo bih se očekivati da vodikove veze neće stabilizirati ili čak da će lagano destabilizirati nativnu strukturu odnosu na nesmotanu. Međutim, s obzirom da su interakcije u

velikoj mjeri elektrostatske prirode, one će biti puno jače u unutrašnjosti proteina gdje je manja dielektrična konstanta. Nadalje, može doći i do entropijskog učinka koji destabilizira vodikove veze između nesmotanog polipeptida i vode time stabilizirajući intramolekulske vodikove veze. Takve vodikove veze će više ograničavati molekule vode, pozicijski i orijentacijski, od onih koje su između drugih molekula voda te je to razlog favoriziranja intramolekulskih vodikovih veza. Ovi efekti objašnjavaju opažanje da mutageno uklanjanje vodikovih veza smanjuje stabilnost proteina. Unatoč niskoj stabilnosti, vodikove veze proteina pružaju osnovni strukturni temelj za smatanje u nativnu strukturu. Ako bi se protein smotao na način koji sprječava stvaranje nekih vodikovih veza, njihova slobodna energije bila bi izgubljena te bi takva konformacija bila manje stabilna od one koja u potpunosti ostvaruje sve vodikove veze. Formiranje α -zavojnica i β -nabranih ploča, o kojima govorimo kasnije, primjer je zadovoljavanja zahtjeva polipeptidne okosnice za vodikovim vezanjem. Ono što omogućuje proteinima da ostvare sve potencijalne vodikove veze jest to da su većina vodikovih veza zapravo lokalne. To znači da uključuju donore i akceptore koji su bliski u sekvenci, najčešće udaljeni za 3 ili 4 aminokiselinska ostatka. Potencijal vodikove veze, u najjednostavnijoj formi, opisuje se sljedećom funkcijom (3) gdje je: D - energija disocijacije, r - prava duljina veze, r_0 - ravnotežna duljina veze, n – parametar povezan sa potencijalom ionizacije.^{9,13-15,17}

$$V(r) = D \left[1 - e^{-\frac{n(r-r_0)^2}{2r}} \right] \quad (3)$$

2.3.6. HIDROFOBNI EFEKT

Hidrofobni efekt naziv je za one utjecaje koji uzrokuju da nepolarne tvari umanjuju kontakt s vodom i da amfipatske molekule tvore micle u vodenim otopinama. Budući da nativni proteini tvore neku vrstu intramolekulske micle u kojoj njihovi nepolarni bočni ogranci uglavnom nisu u kontaktu s vodenim otapalom, hidrofobne interakcije važne su odrednice proteinskih struktura.

Hidrofobni efekt proizlazi iz ranije navedenih posebnih svojstava vode kao otapala. Jedna od njih je visoka dielektrična konstanta. Naime, druga polarna otapala kao dimetil sulfoksid imaju tendenciju denaturirati proteine. Termodinamički podatci daju uvid u podrijetlo hidrofobnog efekta. Prijenos nepolarnog bočnog lanca s vanjske površine proteina koji je u vodenom mediju, u unutrašnji prostor proteina rezultira negativnom promjenom slobodne Gibbsove energije, što proces čini spontanim. Entalpijska promjena je blago negativna ili blago pozitivna za alifatske skupine. Međutim, entropijska komponenta velika je i negativna, iz čega je očito da je prijenos nepolarne skupine proteina iz vodene sredine u nepolarnu unutrašnjost entropijski gonjeno. Tekuća voda ima visoko uređenu i opsežnu mrežu vodikovih veza te nepolarna skupina ometa ovakvu strukturu jer ne može ni prihvatiti ni tvoriti vodikove veze. Molekule vode koje obitavaju oko takve skupine također gube mogućnost uobičajenog opsežnog vodikovog vezanja te se moraju usmjeriti tako da međusobno formiraju mrežu vodikovih veza i istodobno okružuju nepolarnu skupinu. Na ovaj način gradi se kavez uređenih voda jer je broj mogućih načina stvaranja veza oko nepolarne površine znatno manja nego u vodenom mediju. Nepovoljna slobodna energija hidratacije nepolarne tvari uzrokuje

agregaciju nepolarnih skupina čime se minimizira dodirna površina s vodom, odnosno minimizira se broj molekula vode koje u tom procesu sudjeluju, a time se minimizira i entropijski gubitak čitavog sustava. Hidrofobne sile su stoga među glavnim pogonskim snagama tijekom smatanja proteina u nativnu strukturu. Sile koje drže nepolarne regije molekula na okupu često se nazivaju hidrofobnim silama, mada ta terminologija može biti zbunjujuća jer snaga interakcija nije posljedica ikakvih intrinzičnih privlačenja između nepolarnih dijelova. Umjesto toga, hidrofobni efekt je rezultat postizanja najveće termodinamičke stabilnosti sustava minimiziranjem broja uređenih molekula voda koje okružuju hidrofobni dio otopljene molekule.^{6,9,13-15}

2.4. PROTEINSKA STRUKTURA

Struktura velikih molekula poput proteina može se opisati na nekoliko razina složenosti, raspoređenih u svojevrsnoj konceptualnoj hijerarhiji. Obično se definiraju četiri razine proteinske strukture: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura. Za svaku spomenutu strukturu navedene su prethodno opisane međumolekulske interakcije koje ih omogućuju. Navedene su kako bih se osvijestila važnost međumolekulskih interakcija koje se javljaju u proteinskim sustavima.¹⁹

2.4.1. PRIMARNA STRUKTURA PROTEINA

Aminokiselinski slijed proteina naziva se njegovom primarnom strukturom. Peptidne veze su jedine veze koje uistinu stabiliziraju primarnu strukturu te su jedine relevantne veze zaslužne za postojanje primarne strukture.

Poznavanje aminokiselinskog slijeda proteina je bitno za razumijevanje njegovog molekuskog mehanizma djelovanja kao i preduvjet za objašnjenje trodimenzionalne strukture. Kemija bočnih lanaca aminokiselina je presudna za strukturu jer nabijeni bočni lanci mogu stupati u ionske interakcije, polarni lanci formiraju vodikove veze, a nepolarni lanci djeluju putem van der Waalsovih interakcija. Zbog međudjelovanja bočnih lanaca, redoslijed i mjesto aminokiselina je vodič gdje se u tom proteinu događaju savijanja i nabori.

Usporedbom slijeda analognih proteina koji pripadaju istoj ili srodnoj vrsti, dobiva se važan uvid u to kako proteini funkcioniraju te naznačuju evolucijski odnos proteina i organizama koji ih proizvode. Uz to sekvence aminokiselina imaju važnu kliničku ulogu jer su mnoge naslijeđene bolesti uzrokovane mutacijama koje dovode do promjene aminokiselina u proteinima. Veliku primjenu sekvenci nalazimo i u homolognom ili komparativnom modeliranju koje koristi sekvence proteina kojima strukture nisu poznate i bazu podataka strukturno proučenih proteina sa sličnim sljedovima radi predviđanja trodimenzionalne strukture nepoznatih proteina. Iz baze poznatih proteina mogu se odrediti pojedini trendovi u interakcijama unutar polipeptida koje dovode do smatanja proteina, a time i do ciljane funkcije, čime se omogućuje bolje razumijevanje, ali i predviđanje i sinteza ciljanih makromolekula.^{6,15}

2.4.2. SEKUNDARNA STRUKTURA PROTEINA

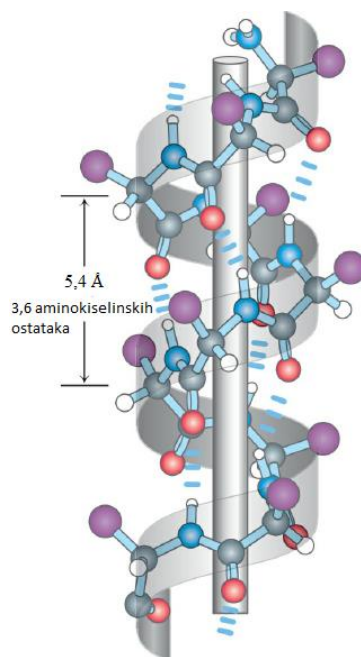
Sekundarna struktura definira se kao lokalna konformacija peptidne okosnice. Za proteine su to specifični obrasci smatanja polipeptidne okosnice kao što su: α -zavojnice, β -nabrane ploče, β -okreti i Ω -omče. Prije spomenuta geometrijska svojstva peptidne veze važna su jer naznačuju da je okosnica proteina povezan slijed krutih planarnih peptidnih veza. Možemo stoga definirati i opisivati konformaciju okosnice polipeptida pomoću torzijskih kuteva. Važno je napomenuti da postoje sterička ograničenja na torzijske kuteve koja ograničavaju konformacijski raspon okosnice.^{6,15}

SPIRALNE STRUKTURE: α -ZAVOJNICE

Zavojnice su najupečatljiviji elementi sekundarne strukture proteina. Polipeptidni lanac uvijen je oko svakog svog ugljikovog atoma u okosnici i zauzima oblik zvojnice. Interakcije koje drže na okupu zavojnice i ostale sekundarne strukture su velikim dijelom vodikove veze.

Najčešći oblik sekundarne strukture je α -zavojnica koju karakterizira 3,6 aminokiselinskih ostataka po okretu visine 5,4 Å što je prikazano na slici 1. Vodikove veze su tako smještene da je peptidna N-H veza n-tog ostatka, usmjerena uzduž zavojnice prema (n+4)-toj peptidnoj vezi. To rezultira jakim vodikovim vezama koje imaju gotovo optimalnu udaljenost od 2,8 Å. Svaki atom u okosnici sposoban za stvaranje vodikovih veza, na taj način sudjeluje u njima. Izuzetak su krajevi α -zavojnice, gdje uvijek postoje tri ili četiri aminokiselinska ostatka koji ne mogu sudjelovati u ovom spiralnom obrascu vezanja vodikovim vezama. S obzirom na to da su krajevi izloženi otapalu, vežu se vodikovim vezama s molekulama vode. Druga mogućnost je da se spajaju s drugim dijelovima lanca kako bi se nadomjestile vodikove veze. K tomu, jezgra α -zavojnice je gusto pakirana tj. njeni atomi su u van der Waalsovom kontaktu. Time se maksimizira energija asocijacije, a bočni lanci se pružaju prema van, od zavojnice, kako bi izbjegli steričke smetnje s polipeptidnom okosnicom, ali i međusobno.^{6,15}

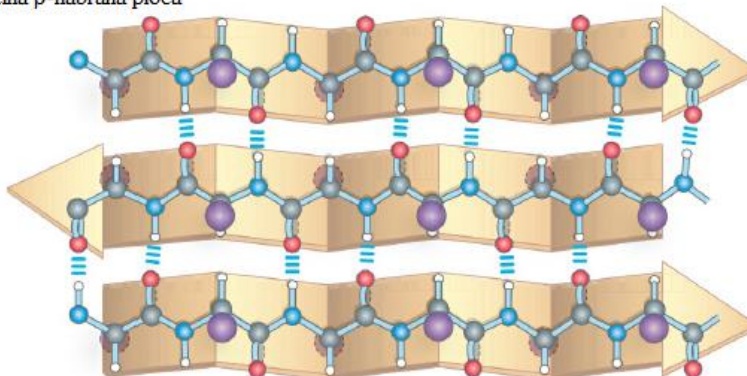
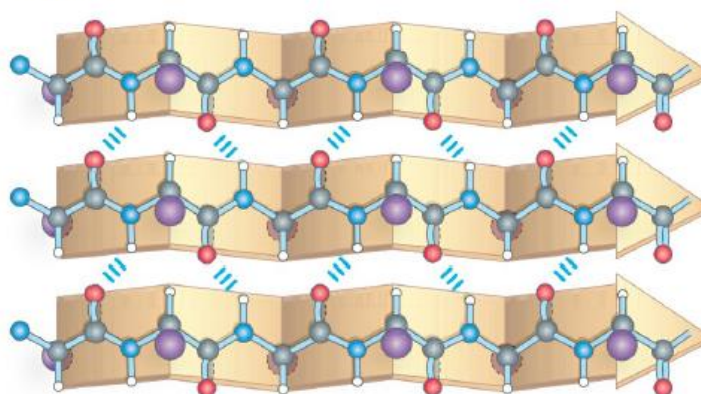
Ne mogu svi polipeptidi formirati stabilne α -zavojnice. To ovisi o mogućim interakcijama koje ostvaruju aminokiselinski ostatci te o njihovom rasporedu unutar primarne strukture. Interakcije između bočnih lanaca mogu stabilizirati ili destabilizirati α -zavojnicu. Na primjer, ako polipeptidni lanac ima dugi segment Glu ostataka, taj segment neće tvoriti heliks pri fiziološkim uvjetima jer znamo da su njihovi bočni lanci negativno nabijeni i međusobno se odbijaju. Isto vrijedi i za pozitivno nabijene Lys ili Arg ostatke. No suprotan efekt tj. stabilizacija postiže se ako se pozitivno nabijen lanac nađe tri aminokiselinska ostatka udaljena od negativnog jer tada dolazi do ionskih interakcija. Kao što je već spomenuto, α -zavojnica posjeduje dipolni moment zahvaljujući dipolnom momentu peptidnih veza koje su usmjerene upravo radi formiranja idealnih vodikovih veza.^{6,15}



Slika 1. Model α -zavojnice sa navedenim parametrima (D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 120)

β -NABORANE PLOČE

Riječ je o proširenijoj konformaciji polipeptidnih lanaca. U β -pločama ili β -naboranim listovima okosnica polipeptidnog lanca proteže se u cik-cak strukturu. Raspored nekoliko segmenata jedan pored drugog, naziva se β -nabrana ploča. Susjedni polipeptidni lanci mogu biti u paralelnoj ili antiparalelnoj orijentaciji tj. imati iste ili suprotne aminokarboksilne orijentacije. Vodikove interakcije u te dvije strukture su drugačije. U paralelnom uređenju, za svaki aminokiselinski ostatak, NH skupina je u vodikovoj interakciji, a CO skupinom na susjednom lancu, a CO skupina u interakciji s NH skupinom 2 ostatka dalje u susjednom lancu. U ovom slučaju vodikove veze su izobličene i nisu linijske. U antiparalelnom uređenju NH i CO skupine svakog ostatka su u interakciji s CO i NH skupinama susjednog ostatka, čime se dobivaju linearne vodikove veze.^{6,15}

Antiparalelna β -nabrana pločaParalelna β -nabrana ploča

Slika 2. β -konformacije polipeptidnog lanca: antiparalelna gore i paralelna (D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 123)

β -OKRETI

β -okreti su česti u proteinima te služe kao poveznice između zavojnica i β -nabranih ploča ili kao elementi koji mijenjaju smjer polipeptidne okosnice. Takvo svojstvo je rezultat vezanja vodikovim vezama unutar lanca, ali i na pozicijama n i $(n+3)$. Najčešće se nalaze na površini proteina jer se tamo aminokiselinski ostatci β -okreta mogu stupati u interakciju s molekulama vode i tvoriti dodatne vodikove veze, čime stabiliziraju strukturu.^{6,15}

2.4.3. TERCIJARNA STRUKTURA PROTEINA

Ukupni trodimenzionalni raspored svih atoma u proteinu naziva se tercijarnom strukturom proteina. Dok se termin sekundarna struktura odnosi na prostorni raspored aminokiselinskih ostataka koji su susjedni u segmentu polipeptida, tercijarna struktura uključuje čitavu aminokiselinsku sekvencu polipeptidnog lanca. Aminokiseline koje su u polipeptidnoj sekvenci daleko jedna od druge i nalaze se u različitim tipovima sekundarne strukture, mogu doći blizu i interagirati unutar tercijarne strukture nativnog proteina. Segmenti polipeptidnog lanca održavaju se u svom tercijarnom položaju putem već spomenutih slabih nekovalentnih interakcija (a ponekad i disulfidnim vezama).

S obzirom na višu razinu strukture, korisno je definirati dvije glavne skupine u koje se mogu svrstati: nitasti proteini i globularni proteini. Funkcije i struktura im se razlikuju, nitasti proteini pružaju potporu, oblik i vanjsku zaštitu organizmima dok globularni čine većinu enzima. Većina nitastih proteini sjeu netopljivi u vodi jer posjeduju veliku koncentraciju hidrofobnih aminokiselina. Njihova primarna struktura je ponavljajuća kako bi se mogla dobiti zavijena struktura koja im je karakteristična

Kod globularnih proteina bočni lanci su također prostorno raspodijeljeni prema njihovim polaritetima. U globularnim proteinima polipeptidni lanac se savija na način da ima sferičnu vanjsku površinu, što je rezultat pozicioniranja bočnih lanaca u strukturu koja je uglavnom stabilizirana hidrofobnim efektom. Većina hidrofobnih bočnih lanaca nalazi se u unutrašnjosti proteina, a na vanjskoj površini proteina su nabijene i nenabijene polarne skupine. Tako se optimizira energija hidratacije jer stupaju u elektrostatske interakcije s otapalom. Koliko je jedan tipičan globularan protein gusto pakiran nam može opisati mioglobin; u njegovoj unutrašnjosti ima mjesta za samo četiri molekule vode. U ovakvom okruženju, nepolarni lanci su u takvoj blizini da kratke van der Waalsove interakcije značajno doprinose hidrofobnim interakcijama.

Polipeptidni lanci koji se sastoje od više od 200 ostataka, obično se preklapaju u dva ili više globularnih klastera poznatih kao domene, koji tim proteinima daju bi- ili multi-globularan izgled. Domene su najčešće povezane jednim dijelom lanca, no strukturno su neovisne jedinice koje često imaju i zasebnu funkciju unutar proteina. One se sastoje od dva ili više sloja sekundarnih elemenata da bi zatvorili hidrofobnu jezgru od doticaja vode. Domene često imaju specifičnu funkciju. Mjesta vezanja često se pojavljuju u pukotinama između domena i tako može doći do interakcije sa skupinama iz dvije domene.^{6,15,20}

2.4.4. KVATERNA STRUKTURA PROTEINA

Proteini zbog svojih polarnih i nepolarnih dijelova, prijanjaju na gotovo sve, osim drugih proteina. Razlog tomu je to što je evolucija rasporedila površinske skupine proteina tako da sprečavaju njihovo povezivanje pri fiziološkim uvjetima. Da to nije slučaj, došlo bi do nespecifičnog agregiranja proteina te bi oni bili beskorisni.

Većina proteina sastavljeno je od više od jednog polipeptidnog lanca. Ove polipeptidne podjedinice se vežu na specifičan način. Prostorni raspored ovih podjedinica poznat je kao kvaterna struktura proteina. Nekoliko je razloga zbog kojih su proteini u više cjelina tako česti. U velikim skupinama proteina, prednosti izgradnje podjedinice u odnosu na sintezu jednog ogromnog polipeptidnog lanca jest u popravcima tj. defekti se mogu popraviti

jednostavnom zamjenom oštećene podjedinice, a ne cijelog proteina. Nadalje mjesto proizvodnje podjedinica može biti drugačije od mjesta smatanja u nativnu konformaciju. Izgradnja podjedinica mnogih enzima pruža strukturnu osnovu za regulaciju njihovih aktivnosti što je ključno za pravilno biokemijsko funkcioniranje.

Spajanje dviju podjedinica obično zahtjeva 1000 do 2000 Å² i te regije nalikuju unutrašnjim regijama proteina jer sadrže usko zbijene nepolarne bočne lance, vodikove veze, a u nekim slučajevima i disulfidne veze. Međutim, protein-protein interakcijske površine se u nekoliko aspekata razlikuju od unutrašnjosti tipičnih proteina. Većina vodikovih veza koje se stvaraju su među bočnim lancima aminokiselina dok u unutrašnjosti proteina većina ih je među atomima okosnice. Razlog tomu je što su na granicama podjedinica sekundarni elementi kojima strše bočni lanci. Solni mostovi su veoma česti na dodirnim ploham podjedinica jer doprinosi specifičnosti i stabilnosti povezanih podjedinica.^{6,15,20}

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 25-30.
2. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 75-85.
3. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, New York, 1995, str. 67-80.
4. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/P04749> (datum pristupa 02.srpnja 2019.)
5. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/P04898> (datum pristupa 02.srpnja 2019.)
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 35-59.
7. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 85-89.
8. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, New York, 1995, str. 259.
9. M. Sippl, J. P. Zbilut, T. Scheibel, *Protein structure prediction and molecular forces*, Chapter 5, Protein Folding-Misfolding: Some Current Concepts of Protein Chemistry, NYNova publishers, Hauppauge, 2006, str. 117-140.
10. K. Roy, S. Kar, R. N. Das, *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts*, Springer International Publishing, New York, 2015, str. 9-13.
11. J. H. Jensen, *Molecular Modeling Basics*, CRC Press, Boca Raton, 2010, str. 25-29
12. Born, M., and Mayer, J. E. (1932). *Z. Physik.* 75, 1.
13. G. N. Ramachandran, *Chem. Biol. Drug Des.* **1** (1969) 5-17.
14. G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, **23** (1968) *Adv. Protein Chem.* 347-367
15. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, New York, 1995, str. 221-265.
16. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 54-55.
17. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 47-54.

18. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, second edition, John Wiley & sons, New York, 1995, str. 40-51.
19. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 96-97
20. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2012, str. 125-148